



IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE MOSQUITOS POTENCIALES  
VECTORES DE ARBOVIRUS PRESENTES EN ZONA SELVÁTICA, RURAL Y URBANA  
DEL DISTRITO DE SANTA MARTA.

ANGIE CAROLINA DUARTE PILONIETA

UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA

Facultad (Ciencias Básicas)

Programa (Biología)

Santa Marta, Colombia

2021



IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE MOSQUITOS POTENCIALES  
VECTORES DE ARBOVIRUS PRESENTES EN ZONA SELVÁTICA, RURAL Y URBANA  
DEL DISTRITO DE SANTA MARTA.

ANGIE CAROLINA DUARTE PILONIETA

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:  
BIÓLOGO

Director (a):

Gabriel Parra Henao *Biol., MSc., PhD.*

Codirector (a):

José A. Usme Ciro *Biol., MSc., PhD.*

Línea de Investigación:

Taxonomía molecular

Grupo de Investigación:

Centro de Investigación en Salud para el Trópico (CIST)

Universidad del Magdalena

Facultad (Ciencias Básicas)

Programa (Biología)

Santa Marta, Colombia

2021

# Nota de aceptación:

Aprobado por el Consejo de Programa en  
cumplimiento de los requisitos exigidos por la  
Universidad del Magdalena para optar al título de  
(Biólogo)

CESAR AUGUSTO VALVERDE CASTRO

---

**Jurado**

**Santa Marta, 11 de Agosto del 2021**

## *Dedicatoria*

*A mi madre Diana Elena Pilonieta y a mi bisabuela  
Dalia Elena Badillo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias a Dios por ser mi guía espiritual, le agradezco a mi madre Diana Elena Pilonieta por su amor e incondicional apoyo, por dejarme volar y enseñarme todos los valores que me hacen ser una mejor persona, sin ella no hubiera sido posible llegar hasta aquí. Le agradezco a mi bisabuela Dalia Elena Badillo por consentirme tanto, por amarme y estar siempre para mí. Agradezco a mis hermanos Jesús David Suarez y Valentina Suarez por el deseo de querer crecer más, pero en especial a mi pequeña hermana Ángeles Suarez que desde que nació se convirtió en mi motor más grande de vida, gracias a ella sueño con llegar a la cima y poder ofrecerle todo, también le agradezco a mi padrastro Maximino Suarez y a mi abuela María Pilonieta por su apoyo, a toda mi familia gracias. Agradezco a Sergio Andres Mendivil Rivas por su amor y compañía, agradezco a sus padres Neirobis Rivas y Eder Mendivil por su apoyo y por hacerme sentir en casa.

Agradezco profundamente a mi profesor, el Doctor José Aldemar Usme Ciro por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación de tan alto nivel, le doy gracias por toda su dedicación, su confianza, su comprensión y todo el conocimiento que me enseñó que hoy me ayudan a ser una mejor profesional, gracias por el ser humano que hay dentro, gracias por las palabras de aliento en los momentos difíciles, siempre las atesorare. Gracias al Doctor Gabriel Parra Henao por su apoyo, a mis compañeros de laboratorio Paula Quintero, Juan Pablo Franco y Andrew Muñoz por el apoyo en esta pasantía, por compartir sus conocimientos y guiarme. Agradezco a mis amigas de infancia y de secundaria Laura Molinares y María Alejandra Morales por su cariño y por sus palabras de aliento.

Agradezco a la Universidad del Magdalena y a todos mis profesores por ayudarme a crecer académicamente.

# RESUMEN

Pág.VI

Colombia es un país con una gran variedad de ecosistemas, amplia biodiversidad y diferentes entornos climáticos, condiciones que propician la aparición de enfermedades de transmisión vectorial, como el dengue, la malaria, la fiebre chikungunya, entre otras. Al igual que el país, el departamento del Magdalena posee diversos ecosistemas en un amplio rango de pisos térmicos que influyen la supervivencia, desarrollo y diversificación de especies. El objetivo de este estudio fue identificar las especies de mosquitos potenciales vectores de arbovirus presentes en zona selvática, rural y urbana del distrito de Santa Marta mediante sistemática molecular utilizando el gen de Citocromo Oxidasa I. Los especímenes fueron recolectados como parte de las actividades del Centro de Investigación en Salud para el Trópico (CIST) de la Universidad Cooperativa de Colombia. Se utilizaron 50 muestras, de las cuales 14 fueron amplificadas por PCR y secuenciadas usando la aproximación de código de barras de ADN. El análisis filogenético se realizó mediante el método Máxima verosimilitud y el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros (K2P), con 1000 réplicas *ultrafast bootstrap*. Esta estrategia permitió la identificación de 13 especies de los géneros *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora*, *Sabethes*, *Wyeomyia* y *Culex*. Este estudio constituye una contribución original de nueva información de especies potenciales vectores de enfermedades en la Ciudad de Santa Marta y sus alrededores, para la evaluación del riesgo y aplicación de medidas de prevención y control de vectores más eficaces.

**Palabras clave:** Citocromo oxidasa I; código de barras de ADN; Culicidae; Sistemática molecular.

# ABSTRACT

Colombia is a country with a great variety of ecosystems, megadiversity and different climatic environments, and these conditions promote the appearance of diseases, mainly those transmitted by mosquitoes, such as dengue, malaria, and chikungunya. The department of Magdalena also has an enormous diversity of ecosystems in a wide range of thermal floors that influence the survival, development and diversification of species. The objective of this study was to identify the potential arbovirus vector species present in sylvatic, rural and urban areas from the Santa Marta district through molecular systematics using the Cytochrome Oxidase I gene. The mosquito specimens were acquired from the Health Research Center for the Tropics (CIST) of the Universidad Cooperativa de Colombia. Fifty mosquito samples were included in the study, 14 of which were successfully amplified and sequenced through the DNA barcoding approach. The phylogenetic analysis was carried out using the Maximum Likelihood method, the Kimura 2-parameter model (K2P) and 1000 ultrafast bootstrap replicates. This approach allowed the identification of 13 species of the genera *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora*, *Sabethes*, *Wyeomyia* and *Culex*. This study constitutes an original contribution of new information of potential vector species of disease in the City of Santa Marta and its surroundings, as a source for risk assessment and the implementation of successful disease prevention and vector control interventions.

**Keywords:** Cytochrome oxidase I; DNA Barcoding; Culicidae; Molecular systematics.

# Contenido

Pág. VIII

|                                                                                                                               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Resumen.....                                                                                                                  | VI   |
| Contenido.....                                                                                                                | VIII |
| Lista de figuras.....                                                                                                         | IX   |
| Lista de tablas.....                                                                                                          | X    |
| Lista de símbolos.....                                                                                                        | XI   |
| 1. Capítulo 1 .....                                                                                                           | 1    |
| 1. INTRODUCCION.....                                                                                                          | 1    |
| 2. OBJETIVO GENERAL.....                                                                                                      | 3    |
| 3. MATERIALES Y METODOS.....                                                                                                  | 4    |
| 3.1. Area de estudio.....                                                                                                     | 4    |
| 3.2. Estudio de campo.....                                                                                                    | 4    |
| 3.3. Aislamiento de ADN, amplificacion por PCR y secuenciacion.....                                                           | 5    |
| 3.4. Amplificacion del gen mitoncondrial COI.....                                                                             | 6    |
| 3.5. Perfil termico.....                                                                                                      | 6    |
| 3.6. Edicion de secuencias.....                                                                                               | 7    |
| 3.7. Análisis filogenético.....                                                                                               | 7    |
| 4. RESULTADOS.....                                                                                                            | 8    |
| 4.1 Caracterización molecular del gen COI e identificación de especies mediante la estrategia de código de barras de ADN..... | 8    |
| 4.2 El análisis filogenético evidencia una alta diversidad de especies de mosquitos en el área estudiada.....                 | 9    |
| 5. DISCUSION.....                                                                                                             | 15   |
| 6. CONCLUSION.....                                                                                                            | 18   |
| 6. REFERENCIA.....                                                                                                            | 19   |

## LISTA DE FIGURAS

Pág. IX

**Figura 1.** Electroferogramas de 6 muestras del estudio.

**Figura 2.** Análisis filogenético de mosquitos (Díptera: Culicidae) basado en un fragmento de 353 pb del gen COI.

**Figura 3.** Análisis filogenético de mosquitos (Díptera: Culicidae) de la tribu Aedini basado en un fragmento de 372 pb del gen COI.

**Figura 4.** Análisis filogenético de mosquitos (Díptera: Culicidae) de la tribu Aedini basado en un fragmento de 563 pb del gen COI.

**Figura 5.** Análisis filogenético de mosquitos (Díptera: Culicidae) de las tribus Anophelini, Culicini y Sabethini, basado en un fragmento de 563 pb del gen COI.

## LISTA DE TABLAS

Pág. X

**Tabla 1:** Información de las zonas de recolección de las muestras en el distrito de Santa Marta.

**Tabla 2:** Información de primers.

**Tabla 3:** Información de las 15 muestras amplificadas por PCR.

**Tabla 4:** Información de las 14 muestras identificadas y sus respectivos porcentajes de similitud en BLAST y BOLDSYSTEMS.

## LISTA DE SÍMBOLOS

Pág. XI

| SÍMBOLO       | SIGNIFICADO                                         |
|---------------|-----------------------------------------------------|
| (ADN)         | Acido desoxirribonucleico.                          |
| (BLAST)       | Herramienta de búsqueda de alineación local básica. |
| (BOLDSYSTEMS) | Sistema de datos del código de barras de la vida.   |
| (COI)         | Citocromo oxidasa I.                                |
| (ml)          | Mililitro.                                          |
| (msnm)        | Metros sobre el nivel del mar.                      |
| (µl)          | Microlitro.                                         |
| (K2P)         | Kimura 2 parámetros.                                |

# INTRODUCCIÓN

La familia *Culicidae* es uno de los primeros taxa descritos dentro del orden Díptera (Linnaeus 1758) (Woodley *et al*, 2009). Esta familia, dividida en dos subfamilias: Anophelinae y Culicinae, comprende un total de 112 géneros y más de 3.500 especies distribuidas en todo el mundo (Becker *et al*, 2010), principalmente en zonas tropicales y templadas (Beebe, 2018).

Colombia es un país con una gran variedad de ecosistemas, enorme biodiversidad y diversas condiciones climáticas (Lozano, 2008), este país tiene una larga historia de hacer frente a los efectos negativos de las enfermedades transmitidas por mosquitos, históricamente las enfermedades con mayor impacto en la salud pública han sido la malaria y el dengue (Padilla *et al*, 2017). Los vectores de estas enfermedades han sido los mejores estudiados tanto biológica como taxonómicamente debido a su relación con la transmisión de patógenos de importancia médica (Montoya-Lerma *et al*, 2011). Estos organismos poseen una gran adaptabilidad y muestran variaciones en sus mecanismos de desarrollo en una amplia variedad de entornos, bajo diferentes condiciones climáticas cambiantes (Becker *et al*, 2010). Dicha variabilidad climática favorece la diversificación, así como la colonización de especies que actúan como vectores en hábitats nuevos, creando un riesgo continuo para la población humana, primordialmente para aquellas personas que habitan áreas periurbanas, especialmente si las condiciones de salubridad no son adecuadas (Quintero, Osorio y Martínez, 2010). Este país presenta grandes áreas geográficas activas para la transmisión de enfermedades tropicales que involucran a los mosquitos, entre las que se encuentran el dengue, la malaria, la fiebre amarilla, la encefalitis equina venezolana, la fiebre chikungunya y algunas otras arbovirosis de baja circulación como: fiebre mayaro, fiebre Ilheus, entre otras (Hoyos *et al*, 2015).

Debido a la problemática en salud que representan estos vectores, es importante su identificación precisa. La identificación morfológica es el método convencional de referencia para la identificación de especies de mosquitos, con sus características distinguibles permiten su identificación mediante el uso de claves dicotómicas (Chan *et al*, 2014); sin embargo, tiene varias limitaciones debido a la gran plasticidad fenotípica de los individuos, diferencias ontogénicas y dimorfismo sexual, dicha variación en los caracteres hace compleja su identificación (Rozo & Mengual, 2015; Paz, Gonzales & Crarwford, 2011). Por otro lado, la alteración física o pérdida de estructuras morfológicas durante la captura o preservación de algunos especímenes hacen que su identificación sea incompleta (Harbach, 2007).

Debido a las limitaciones derivadas del uso de caracteres morfológicos, el desarrollo de la biología molecular de los años 80's, favoreció la realización de nuevas investigaciones taxonómicas y el surgimiento de nuevas y potentes herramientas de identificación (Munstermann & Conn, 1997). Desde entonces, la taxonomía clásica y molecular se han convertido en un complejo estratégico para la identificación de especies crípticas (Paz, Gonzales & Crarwford, 2011). El método de código de barras de ADN fue postulado por Hebert *et al* (2003 a,b) como un enfoque basado en la secuencia de ADN para la identificación exacta de las especies. La técnica propuesta utiliza un conjunto de cebadores para amplificar una región de 658 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) para la rápida y precisa identificación (Hebert *et al*, 2003 a). El

ADN mitocondrial ha sido uno de los marcadores más populares utilizados para identificar la diversidad animal. Con respecto a la familia *Culicidae* particularmente, existe una considerable cantidad de literatura sobre el uso de secuencias de ADN para la identificación de especies, el código de barras en mosquitos tiene la intención de identificar el mayor porcentaje de especies portadoras de enfermedades y de sus parientes más cercanos (Rozo & Mengual 2015).

En Colombia son varios los departamentos donde se ha implementado la identificación de especies de mosquitos por medio de código de barras (*DNA barcoding*). Uno de ellos es Antioquia donde se identificaron 114 mosquitos mediante COI, obteniendo especies de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762), *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto 1922), *Coquillettidia nigricans* (Coquillett 1904), *Mansonia titillans* (Walker 1848), *Ochlerotatus angustivittatus* (Dyar & Knab 1907), *Psorophora ferox* (Von Humboldt 1819) y *Psorophora sp* (Hoyos, 2018); en el Choco, Guaviare y Córdoba, utilizando COI para especies del género *Anopheles* (Meigen 1818) (Jimenez, Conn & Brochero, 2014; Ahumada *et al*, 2016); en Quindío, municipio la Tebaida se identificó por primera vez *Aedes albopictus* (Skuse 1895) utilizando COI y fueron los primeros registros de secuencias de COI para esta especie en el país (Zamora, Castaño & Hoyos, 2015), finalmente, también en el Quindío, fueron identificadas cinco especies pertenecientes a los géneros *Aedes* (Meigen 1818) y *Culex* (Linnaeus 1758) (Hoyos *et al*, 2015).

De acuerdo con lo mencionado, en Colombia existen departamentos donde se presentan algunas arbovirosis como el Dengue y la fiebre amarilla registradas en regiones del Valle medio del río Magdalena, Catatumbo, los Llanos orientales, la Amazonia, las estribaciones de la sierra Nevada de Santa Marta, estas enfermedades han constituido un problema de salud pública (Parra & Suarez, 2012). Es por esto que la rápida identificación de especies en sectores como el Distrito de Santa Marta - Colombia es de gran importancia, ya que el departamento del Magdalena cuenta con diversos ecosistemas con diferentes climas: cálido, templado, frío, paramo, nevado y estos tienen una gran influencia en la presencia y abundancia de mosquitos (Betancourt, LLambias, Pestano y León, 2017). Debido a que esta área geográfica ha sido poco estudiada se pretende realizar la identificación de especies de mosquitos presentes en tres zonas: Urbana, Rural y selvática, utilizando la taxonomía molecular mediante el gen COI, con el fin de ampliar los estudios y determinar futuras medidas de control a la posible aparición de especies potenciales transmisoras de arbovirus.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las especies de mosquitos potenciales vectores de arbovirus presentes en zona selvática, rural y urbana del Distrito de Santa Marta mediante sistemática molecular utilizando el gen de la Citocromo Oxidasa I.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Área de estudio

El Distrito de Santa Marta se encuentra conformado por un mar territorial, áreas montañosas como la Sierra Nevada, islas y bahías localizadas en el mar territorial, posee una zona costera y zona continental. Los suelos consolidados por acciones antrópicas o naturales que no hacen parte de la reserva ambiental pertenecen al Distrito en terreno urbano. Por el Norte y el Oeste limita con el Mar Caribe, al sur con los municipios de Ciénaga y Aracataca y por el oriente con los departamentos de la Guajira y Cesar. Tiene una extensión total de 2,393.35 km<sup>2</sup> que pertenecen a 55.10 km<sup>2</sup> del área urbana y 2,338.25 km<sup>2</sup> del área rural. Se encuentra comprendida entre los 0 msnm de altitud con una elevación máxima de 5.775 msnm en las cumbres de la Sierra Nevada. Posee un clima cálido y seco, con temperaturas entre los 23 – 32° C y humedad relativa del 77% (Alcaldía Distrital de Santa Marta, 2021). Las muestras para este estudio fueron recolectadas en los barrios (Puerto Nuevo, la Bolivariana, la Teneria, las Manguitas y el campus de la Universidad cooperativa de Colombia (UCC)) que pertenecen a zona urbana del Distrito, en la zona rural fueron recolectados en (Quebrada Valencia y Marquetalia) y en la zona selvática se recolectaron en el sector de quebrada Valencia.

## Estudio de campo

Los 50 especímenes de mosquitos se obtuvieron en zona urbana, rural y selvática, como parte de las actividades de campo del Centro de Investigación en Salud para el Trópico (CIST) a través de los proyectos INV1913 e INV2174, que contaron con el apoyo y la participación del Grupo de ETV de la Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta. Las muestras fueron almacenadas en viales de 1,5 ml con etanol absoluto y a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

**Tabla 1: Información de las zonas de recolección de las muestras en el distrito de Santa Marta.**

| ZONA      | MUNICIPIO   | CORREGIMIENTO | VEREDA                  | LATITUD    | LONGITUD    | MUESTRA  |
|-----------|-------------|---------------|-------------------------|------------|-------------|----------|
| Rural     | Santa Marta | Guachaca      | Quebrada valencia/rural | 11,2402778 | -73,8025    | CIST0297 |
| Urbano    | Santa Marta | Guachaca      | Puerto Nuevo            | 11,2504167 | -73,83125   | CIST0301 |
| Selvático | Santa Marta | Guachaca      | Quebrada Valencia       | 11,2391389 | -73,8036667 | CIST0314 |
| Selvático | Santa Marta | Guachaca      | Quebrada Valencia       | 11,2391389 | -73,8036667 | CIST0321 |
| Selvático | Santa Marta | Guachaca      | Quebrada Valencia       | 11,2391389 | -73,8036667 | CIST0326 |
| Urbano    | Santa Marta | Santa Marta   | Barrio Bolivariana      | 11,224178  | -74,170181  | CIST0340 |

|        |             |             |                                   |            |             |          |
|--------|-------------|-------------|-----------------------------------|------------|-------------|----------|
|        |             |             |                                   |            |             |          |
| Urbana | Santa Marta | Santa Marta | Barrio La teneria/Puerto Mosquito | 11,2354722 | -74,2188333 | CIST0388 |
| Urbana | Santa Marta | Santa Marta | Barrio La teneria/Puerto Mosquito | 11,2354722 | -74,2188333 | CIST0389 |
| Urbana | Santa Marta | Santa Marta | Barrio La teneria/Puerto Mosquito | 11,2354722 | -74,2188333 | CIST0390 |
| Urbana | Santa Marta | Santa Marta | Barrio La teneria/Puerto Mosquito | 11,2354722 | -74,2188333 | CIST0393 |
| Urbana | Santa Marta | Santa Marta | Barrio La teneria/Puerto Mosquito | 11,2354722 | -74,2188333 | CIST0394 |
| Urbana | Santa Marta | Santa Marta | Barrio Las Manguitas/La Paz       | 11,1498333 | -74,2194722 | CIST0404 |
| Rural  | Santa Marta | Guachaca    | Marquetalia                       | 11,243811  | -73,573897  | CIST0467 |
| Urbana | Santa Marta | Santa Marta | UCC                               | 11,132584  | -74,101485  | CIST0546 |

## Aislamiento de ADN, amplificación por PCR y secuenciación

Con la ayuda de unas pinzas estériles se tomaron las patas, tórax y cabeza de los mosquitos hembra. Se realizó una homogenización manual con pistilos que mediante la fricción con la pared del tubo permitieron la disociación del tejido, posterior a esto se realizó la extracción de DNA total utilizando el estuche comercial *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN Inc, Heidelberg, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante y ajustes descritos previamente (Muñoz *et al*, 2021). Brevemente, se adicionaron 180 µm de buffer ATL al espécimen macerado y 20 µm de proteinasa K. Se homogenizó la mezcla por 3 minutos y se procedió con una incubación a 56°C por 1 hora, hasta evidenciar que el tejido estuviera completamente lisado. Se adicionaron 200 µm de buffer AL y 200 µm de etanol

(96-100%) y se mezcló nuevamente por vortex. Algunas muestras presentaron un precipitado blanco que no interfirió con el procedimiento. La mezcla que se obtuvo se transfirió a una columna (*DNeasy mini spin*) puesta en un tubo colector de 2 ml y se centrifugó a  $\geq 6000$  g por 1 minuto, luego se reemplazó el tubo colector y se adicionaron 500  $\mu$ m de buffer AW1 seguido de centrifugación a  $\geq 6000$  g por 1 minuto. Se reemplazó nuevamente el tubo colector y se adicionaron 500  $\mu$ m de buffer AW2 seguido de centrifugación por 3 minutos a 14.000 rpm con el fin de secar la membrana *DNeasy*. Finalmente, se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 o 2 ml, se le agregaron 100  $\mu$ m de buffer AE directamente en la membrana de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a  $\geq 6000$  g por 1 minuto para permitir la elución del DNA. Este procedimiento se describe en detalle en el documento *DNeasy Blood & Tissue Handbook* (HB-2061-003).

## Amplificación del gen mitocondrial *Citocromo Oxidasa I*

Para la amplificación del gen mitocondrial que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I (COI) se utilizaron los oligonucleótidos universales LCO1490 y HCO2198 que amplifican un fragmento de 710 pb (Folmer *et al*, 1994), así como los oligonucleótidos Kumar2007\_F y Kumar2007\_R que amplifican un fragmento de 700 pb y que constituyen un consenso de lo propuesto por Herbert *et al*. 2003 y Simón. 1994 (Kumar *et al*, 2007), para lograr una mayor amplificación (Tabla 2).

Se realizaron mezclas de reacción con volúmenes finales de 25  $\mu$ l. Cada reacción incluyó 10 $\mu$ l de DNA, 9.25 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 2.5mM de Buffer, 1mM de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleótido y por último, 1.25 U de DreamTaq DNA Polimerasa (Thermo Scientific, Waltham, EEUU).0

**Tabla 2: Información de primers.**

| Nombre del Primer | Secuencia                         | Fragmento amplificado | Región | Referencia                 |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------|----------------------------|
| LCO1490_F         | 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'   | 710 pb                | 5'     | Folmer <i>et al</i> , 1994 |
| LCO2198_R         | 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'  | 710 pb                | 3'     | Folmer <i>et al</i> , 1994 |
| Kumar2007_F       | 5'-GGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTT-3'   | 700 pb                | 5'     | Kumar <i>et al</i> , 2007  |
| Kumar2007_R       | 5'-AAAAATTTTAATTCCAGTTGGAACAGC-3' | 700 pb                | 3'     | Kumar <i>et al</i> , 2007  |

## Perfil térmico

El perfil térmico fue el mismo para ambas amplificaciones y consistió en un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos de (94°C durante 30 segundos para desnaturalización, 54°C durante 30 segundos para la hibridación de oligonucleótidos y 72°C durante 1 minutos para la extensión), seguido de una extensión final a 72°C durante 10 minutos (Kumar *et al*, 2007). Una alícuota de 5  $\mu$ l cada producto de PCR se utilizó para su visualización mediante electroforesis. Los productos de PCR obtenidos fueron

purificados y secuenciados a través de la empresa Macrogen (Macrogen Inc, Corea del Sur).

## Edición de secuencias

Las secuencias obtenidas ensambladas y editadas mediante el software Geneious V9.1.8 (Biomatters Ltd., EEUU) para garantizar la correcta asignación de bases y delimitación de regiones mediante la eliminación de secuencias de hibridación de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Luego se llevaron a la plataforma de análisis y almacenamiento de datos BOLD SYSTEMS ([https://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](https://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)) y a la herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de encontrar los porcentajes más confiables de similitud entre cada secuencia obtenida en el presente estudio y la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y así poder identificar la especie.

## Análisis filogenético

Posteriormente se creó una matriz con secuencias de nucleótidos previamente obtenidas de las bases de datos mencionadas y las secuencias obtenidas en el presente estudio. Mediante la herramienta ClustalW disponible en el software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7* (MEGA7) (Kumar, Stecher & Tamura, 2016) se llevó a cabo el alineamiento de regiones homólogas. Finalmente se realizó inspección visual del alineamiento con el fin de verificar la existencia de indels.

A partir de la matriz inicial que incluía 346 secuencias representativas de las especies en análisis, se utilizó el software CD-HIT Suite: *Biological Clustering and Comparison* (Huang *et al*, 2010) para la eliminación de aquellas secuencias que tuvieran más del 99% de identidad entre ellas y de esa manera poder conservar solo secuencias que tuvieran un nivel de heterogeneidad para representar de mejor manera la variabilidad genética y garantizar una mejor resolución de las relaciones filogenéticas al interior de las especies y entre especies.

Con el fin de inferir las relaciones filogenéticas con base en las secuencias de nucleótidos utilizadas, se estimó el mejor modelo de sustitución nucleotídica mediante el software IQ-TREE (Trifinopoulos *et al*, 2016), y de manera simultánea se estimó la filogenia por el método de Máxima verosimilitud con 1000 réplicas *Ultrafast Bootstrap* (Efron, 1979). El árbol consenso fue editado en el software MEGA.

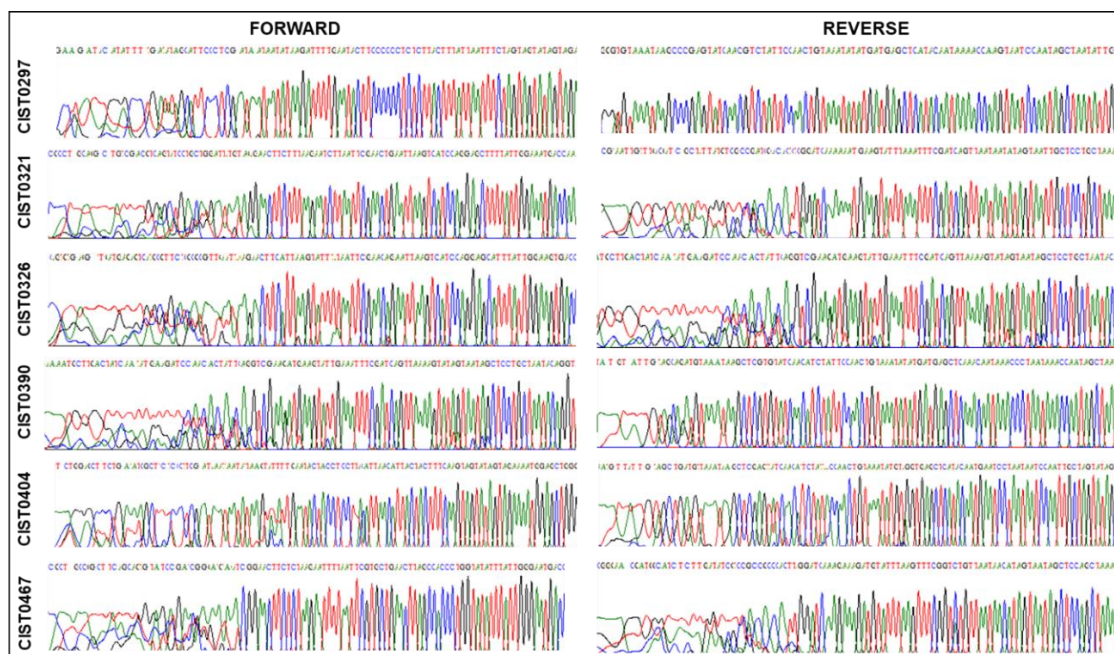
# RESULTADOS

## Caracterización molecular del gen COI e identificación de especies mediante la estrategia de código de barras de ADN

Para el estudio se seleccionaron un total de 50 muestras de mosquitos, 15 de las cuales lograron ser amplificadas por PCR y 14 de las cuales fueron secuenciadas exitosamente (Tabla 3), con la obtención de electroferogramas y ensamblajes de buena calidad (Figura 1).

**Tabla 3: Información de las 15 muestras amplificadas por PCR.**

| Muestra  | Zona      | Vereda/Barrio     | Secuenciadas con éxito | Especie                          |
|----------|-----------|-------------------|------------------------|----------------------------------|
| CIST0297 | Rural     | Quebrada Valencia | Si                     | <i>Anopheles neomaculipalpus</i> |
| CIST0301 | Urbana    | Puerto Nuevo      | Si                     | <i>Aedes aegypti</i>             |
| CIST0314 | Selvático | Quebrada Valencia | Si                     | <i>Sabethes sp</i>               |
| CIST0321 | Selvático | Quebrada Valencia | Si                     | <i>Wyeomyia arthrostigma</i>     |
| CIST0326 | Selvático | Quebrada Valencia | Si                     | <i>Sabethes sp</i>               |
| CIST0340 | Urbana    | Bolivariana       | Si                     | <i>Culex pipiens</i>             |
| CIST0388 | Urbana    | La tenería        | Si                     | <i>Aedes aegypti</i>             |
| CIST0389 | Urbana    | La tenería        | Si                     | <i>Culex pipiens</i>             |
| CIST0390 | Urbana    | La tenería        | Si                     | <i>Culex pipiens</i>             |
| CIST0393 | Urbana    | La tenería        | Si                     | <i>Aedes aegypti</i>             |
| CIST0394 | Urbana    | La tenería        | Si                     | <i>Aedes aegypti</i>             |
| CIST0404 | Urbana    | Las Manguitas     | Si                     | <i>Culex nigripalpus</i>         |
| CIST0429 | Urbana    | Santa Catalina    | No                     |                                  |
| CIST0467 | Rural     | Marquetalia       | Si                     | <i>Aedes aegypti</i>             |
| CIST0546 | Urbana    | UCC               | Si                     | <i>Psorophora cyaneescens</i>    |



**Figura 1.** Electroferogramas de 6 muestras representativas del estudio. Cada una constituye la secuencia forward y reverse de ADN de 6 especies que hacen parte de 5 de los 6 géneros identificados, CIST0297 (*An. neomaculipalpus*), CIST0321 (*W. arthrostigma*), CIST00326 (*Sabethes sp*), CIST0390 (*C. pipiens*), CIST0404

(*C. nigripalpus*) y CIST0467 (*Ae. Aegypti*). Se observa el patrón esperado de estabilización de los picos de fluorescencia a partir de 30 a 50 nucleótidos desde el inicio de la lectura, seguido de secuencias de alta calidad.

A partir del análisis de similaridad utilizando las herramientas BLAST y BOLDSYSTEMS, se identificaron 6 géneros (*Anopheles*, *Aedes*, *Wyeomyia* (Theobald 1901), *Culex*, *Psorophora* y *Sabethes* (Robineau Desvoidy 1827)) y 7 especies (*An. neomaculipalpus* (Curry 1931) (n=1), *Ae. aegypti* (n=5), *W. arthrostigma* (Lutz 1905) (n=1), *C. pipiens* (Linnaeus 1758) (n=3), *C. nigripalpus* (Theobald 1901) (n=1), *P. cyanescens* (Coquillett 1902) (n=1), con porcentajes de similaridad entre 92.31% y 100.00% (Tabla 4). Con respecto al género *Sabethes*, la muestra CIST0326 se identificó en BLAST como *Haemagogus Lucifer* con un porcentaje de similitud de 97.73%, pero al realizar la filogenia dicha especie se agrupó con secuencias de *Sabethes chloropterus* (Von Humboldt 1819) y alejándose del resto de especies de la tribu Aedini, por lo cual se le identificó como *S. Chloropterus*, Con respecto al otro género *Sabethes sp* no se logró identificar su especie en las plataformas, con porcentajes de 90.12% lo más similar fue *Wyeomyia pertinans* (Williston 1896) y con *Wyeomyia testei* (Senevet & Abonnenc 1939) con similitud de 87.82%, este género tampoco se identificó en el análisis filogenético.

**Tabla 4: Información de las 14 muestras identificadas y sus respectivos porcentajes de similitud en BLAST y BOLDSYSTEMS.**

| GÉNERO            | ESPECIE                   | CÓDIGO DE EJEMPLARES | SIMILITUD EN BLAST Y BOLDSYSTEMS |
|-------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------------|
| <i>Anopheles</i>  | <i>A. neomaculipalpus</i> | CIST0297             | 98.87% y 98.86%                  |
| <i>Aedes</i>      | <i>A. aegypti</i>         | CIST0301             | 100.00% y 100.00%                |
|                   | <i>A. aegypti</i>         | CIST0388             | 100.00% y 100.00%                |
|                   | <i>A. aegypti</i>         | CIST0393             | 100.00% y 100.00%                |
|                   | <i>A. aegypti</i>         | CIST0394             | 100.00% y 100.00%                |
|                   | <i>A. aegypti</i>         | CIST0467             | 100.00% y 100.00%                |
| <i>Wyeomyia</i>   | <i>W. arthrostigma</i>    | CIST0321             | 98.87% y 98.86%                  |
| <i>Culex</i>      | <i>C. pipiens</i>         | CIST0340             | 100.00% y 100.00%                |
|                   | <i>C. pipiens</i>         | CIST0389             | 100.00% y 100.00%                |
|                   | <i>C. pipiens</i>         | CIST0390             | 100.00% y 100.00%                |
|                   | <i>C. nigripalpus</i>     | CIST0404             | 100.00% y 100.00%                |
| <i>Psorophora</i> | <i>P. cyanescens</i>      | CIST0546             | 98.87% y 99.72%                  |
| <i>Sabethes</i>   | <i>Sabethes sp</i>        | CIST0314             | 100.00%                          |
|                   | <i>S. chloropterus</i>    | CIST0326             | 92.31% y 94.87%                  |

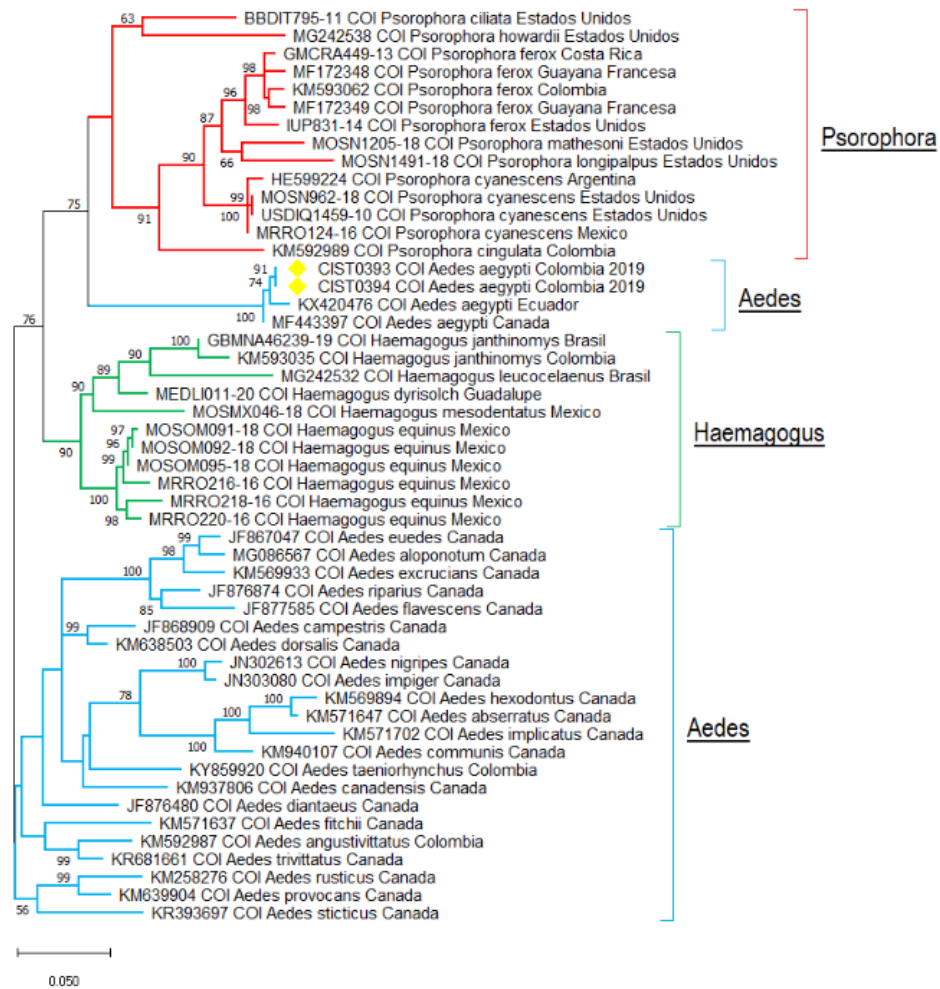
## El análisis filogenético evidencia una alta diversidad de especies de mosquitos en el área estudiada

La matriz de secuencias de COI depurada a través de CD-HIT incluyó un total de 148 secuencias de las tribus Aedini, Sabethini, Anophelini y Culicini. A pesar de que el mejor modelo de sustitución nucleotídica estimado para esta matriz fue el *General Time Reversible* (GTR), teniendo en cuenta los soportes obtenidos de las ramas y diversos reportes en la literatura, en el presente estudio se adoptó el modelo *Kimura-2-Parameters* (K2P).

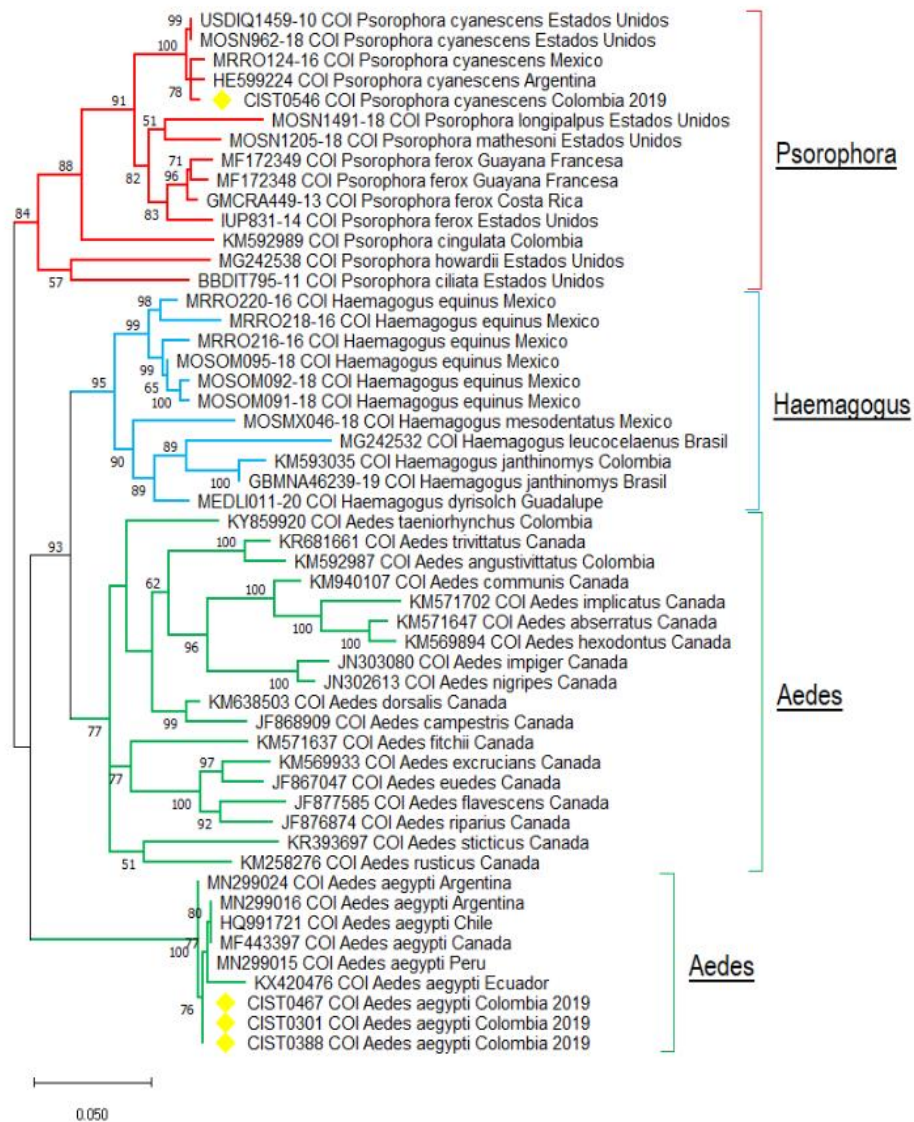
En una primera estimación filogenética, las 14 secuencias de ejemplares obtenidos en el presente estudio se agruparon en sus diferentes tribus: Culicini, Sabethini, Anophelini y Aedini (Figura 2), con soportes de ramas mayores al 50%. Las secuencias correspondientes

a la especie *C. pipiens* se agruparon en un cluster con secuencias de la misma especie previamente reportadas en Estados Unidos y Colombia. La secuencia correspondiente a la especie *C. nigripalpus* se agrupó también con una secuencia de esta especie reportada en Brasil. Para las especies de la tribu Sabethini solo se logró la identificación de 2 de 3 muestras; el análisis filogenético fue determinante para descartar la asignación inicial mediante la aproximación de código de barras de ADN de una secuencia como perteneciente a la especie *H. lucifer*, cuyas especies más estrechamente relacionadas corresponden a la especie *S. chloropterus*, un género y tribu distantes filogenéticamente del género *Haemagogus* y la tribu Aedini. Esta inconsistencia supone una gran limitación para la estrategia de código de barras de ADN, debido a la inexistencia de un proceso de curaduría en la asignación de especies a las secuencias que se registran en las bases de datos. *W. arthrostigma* se agrupó con secuencias de la misma especie de Guayana Francesa. La especie *An. neomaculipalpus* se agrupó con una secuencia representativa de la especie, reportada en Caldas Colombia. Con respecto a la tribu Aedini, la secuencia de la especie *P. cyanescens* se relacionó con secuencias de la misma especie reportadas en México y Estados Unidos, las especies del género *Aedes* de este estudio se agruparon con especies de *Ae. aegypti* de Argentina, Ecuador, Chile, Canadá y Perú, al realizar el análisis el grupo de *Ae. aegypti* se alejó de las demás especies del género, lo cual supuso la realización de otro árbol filogenético solo con los géneros de la tribu Aedini. Con el fin de garantizar la mayor longitud del fragmento de COI analizado y teniendo en cuenta que a nivel metodológico se realizó la amplificación de dos diferentes fragmentos del gen (Protocolos de Folmer *et al*, 1994 y Kumar *et al*, 2007) solapantes en una región de tan solo 353 pb, se construyeron matrices independientes para cada región de COI, en un intento por recuperar la mayor longitud posible que garantizara la máxima señal filogenética y resolver las relaciones entre especies al interior de la tribu. Para el análisis con secuencias del fragmento descrito por Kumar, la longitud de matriz fue de 372 pb y se observó, al igual que en la matriz principal, un distanciamiento de *Ae. egypti* del resto de especies del género *Aedes* (figura 3); en la matriz de secuencias correspondiente al fragmento descrito por Folmer, la longitud fue de 563 pb y se mostró una relación más cercana entre esta especie y los demás miembros del género *Aedes* (Figura 4). Por último, se realizó un análisis con los géneros de la Tribus Culicini, Sabethini y Anophelini (figura 5) con el fin de corroborar las relaciones luego de excluir la tribu Aedini y se observó que la especie *Sabethes sp* no identificada en el análisis de las 4 tribus (Figura 2) muestra una estrecha relación filogenética con una secuencia de la especie *S. chloropterus* reportada en Brasil (NC\_037499) (De Oliveira *et al*, 2019) y otra secuencia Colombiana sin identificación al nivel de especie (CIST0314) (Muñoz *et al*, 2021) (Figura 5).

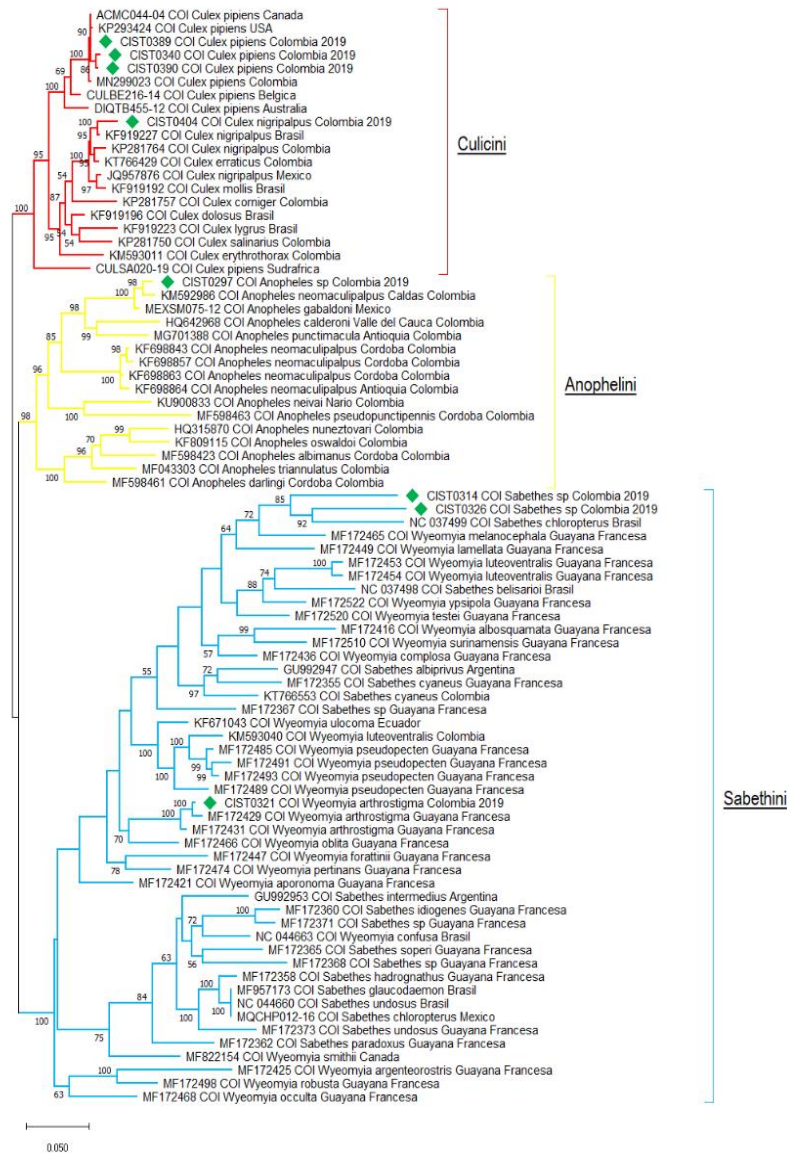
**Figura 2.** Análisis filogenético de mosquitos (Diptera: Culicidae) basado en un fragmento de 353 pb del gen COI. El análisis se realizó a través del método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución K2P con 1000 réplicas bootstrap. Las secuencias fueron agrupadas por tribu. Los rombos morados representan las secuencias obtenidas en el presente estudio.



**Figura 3.** Análisis filogenético de mosquitos (Diptera: Culicidae) de la tribu Aedini basado en un fragmento de 372 pb del gen COI. El análisis se realizó para el fragmento amplificado por el método de Kumar (Kumar *et al*, 2007), a través del método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución K2P con 1000 réplicas bootstrap. Las secuencias fueron agrupadas por género. Los rombos amarillos representan las secuencias obtenidas en el presente estudio.



**Figura 4.** Análisis filogenético de mosquitos (Diptera: Culicidae) de la tribu Aedini basado en un fragmento de 563 pb del gen COI. El análisis se realizó para el fragmento amplificado por el método de Folmer (Folmer *et al*, 1994), a través del método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución K2P con 1000 réplicas bootstrap. Las secuencias fueron agrupadas por género. Los rombos amarillos representan las secuencias obtenidas en el presente estudio.



**Figura 5.** Análisis filogenético de mosquitos (Diptera: Culicidae) de las tribus Anophelini, Culicini y Sabethini, basado en un fragmento de 563 pb del gen COI. El análisis se realizó mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo de sustitución K2P con 1000 réplicas bootstrap. Las secuencias fueron agrupadas por tribu. Los rombos verdes representan las secuencias obtenidas en el presente estudio.

## DISCUSIÓN

Los códigos de barras de ADN constituyen una herramienta para identificar de forma rápida y precisa a partir de cortas secuencias de ADN (Floyd *et al*, 2002). Sin embargo, a pesar de ser una herramienta rápida, tiene sus limitaciones, debido principalmente a que la taxonomía se basa en la confiabilidad de la información de especies previamente registrada en las bases de datos, cuya designación recae en la taxonomía clásica como respaldo a la asignación molecular, también a la carencia de especímenes para corroboración taxonómica o a que los mismos sean depositados en colecciones donde se impida la extracción de ADN (Tautz *et al*, 2003).

El método convencional utilizado para la identificación de especies es la taxonomía clásica (Chan *et al*, 2014), sin embargo este método, se ha basado únicamente en las características morfológicas de los organismos para ser identificados, pero al depender del fenotipo está sujeto a varias limitaciones (Wilson, 1995), evidenciadas por ejemplo, en la dificultad para diferenciar el tipo de poros y setas en cochinillas que limita la exactitud del análisis morfológico (Ortega, Martínez y Agapito, 2014) y siendo en general incompleta en grupos taxonómicos como insectos y plantas (Blaxter, 2003). Además, en algunos casos la taxonomía clásica no puede ser aplicada de forma exitosa en ciertos estadios larvales, fragmentos de tejidos, sangre y escamas ya que no presentan suficientes caracteres para la identificación y sumado a esto, la imposibilidad de disponer de taxónomos expertos para los diferentes grupos taxonómicos y en las diferentes regiones geográficas (Eaton *et al*, 2010).

Debido a esto, hace más de tres décadas la biología molecular se convirtió en una herramienta valiosa en la identificación de organismos, aplicándose en estudios de relaciones filogenéticas (Baker, Cipriano & Palumbi, 1996), siendo una de sus principales ventajas el hecho de que la información molecular pueda ser obtenida a partir de pequeños fragmentos del organismo. Los métodos para la identificación taxonómica molecular han probado tener éxito en muchos casos, donde la carencia de caracteres morfológicos en algunos estadios o sexo para ciertas especies de culícidos les dan una mayor trascendencia a los métodos moleculares para una exitosa y rápida identificación como los códigos de barras de ADN (Díaz *et al*, 2016).

Por otro lado, los códigos de barras de ADN han generado algunas controversias debido a los depósitos donde estas secuencias son registradas. Para que haya un buen funcionamiento de las herramientas moleculares es necesario que las bases de datos donde se adquieren estas secuencias sean confiables y cuenten con un proceso riguroso de verificación de éstas. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede inferir que hubo un error en la identificación taxonómica de algunos especímenes previamente reportados de la especie *H. lucifer*. Linton *et al*. (2002) analizaron secuencias del gen ITS2 de especies pertenecientes a *Anopheles maculipennis* (Meigen 1818) y determinaron que existían errores y discrepancias cuando analizaban secuencias similares de la misma especie. En concordancia con estos hallazgos, se planteó que las bases de datos, al no considerar de donde proviene la identificación de las secuencias (clave taxonómica específica), pueden incluir información errónea o de dudosa procedencia y

estas falencias al parecer no están siendo filtradas mediante un proceso de curaduría para el ingreso a las bases de datos. Por otro lado, en las bases de datos existe baja disponibilidad de secuencias de COI para las especies de este estudio y principalmente son escasos los registros para Colombia. Por ejemplo, secuencias de *Sabethes* se encuentran muy poco representadas (Muñoz *et al*, 2021) para Colombia, con solo dos registros, haciendo difícil su identificación como es el caso de nuestra secuencia derivada del espécimen CIST0314 identificada como *Sabethes sp*.

Lipscomb *et al*. (2003) discute que no hay justificación para darle un mayor peso a los caracteres de ADN con respecto a cualquier otro tipo de carácter, ya que las descripciones de especies se basan en una amplia gama de datos y que a pesar de que los datos moleculares contribuyen en gran medida, si solo se habla sobre su ADN no hay patrones evolutivamente interesantes para explicar, por lo que se propone que la información de ADN sea un punto referencia que complemente la importancia de la descripciones morfológicas.

De acuerdo con los resultados mostrados en el presente estudio, algunas especies del género *Aedes* se encuentran un poco más cercanas a especies del género *Psorophora* que a otras especies del mismo género. Estudios que previamente han descrito las relaciones filogenéticas de *Aedes* muestran esta misma relación con el género *Psorophora* (Soghigian, Andreadis & Livdahl, 2017). En referencia al grado de longitud Wilkerson *et al*, 2015 indica que los códigos de barras que implican la comparación de secuencias cortas del gen mitocondrial COI producen distancias que solo son útiles para diferenciar taxones a nivel de especie y no para estimar sus relaciones. Así mismo a pesar de que la longitud de código de barra suele tener 650 pb, se ha demostrado que regiones tan pequeñas como 100 pb pueden identificar con éxito especímenes de especie (Meusnier *et al*, 2008). Puede que esta sea una causa del alejamiento de *Ae. aegypti* del resto de especies del género *Aedes*, pues se logra la identificación de la especie, pero no se observa la relación con las demás especies del mismo género, que puede ser causa debido a la disminución de la longitud de secuencia de este estudio que fue necesaria para poder lograr el alineamiento de los dos primers utilizados que solo se relacionan en secciones cortas.

En este estudio se identificaron 9 especies de mosquitos hematófagos de la zona urbana, 2 especies en la zona rural y 2 especies en la zona selvática. Tener conocimiento del hábitat y las enfermedades que transmiten estos vectores es importante, pues nos hace estar alertas de su presencia para tomar las medidas de erradicación y prevención para la posible transmisión de enfermedades. Especímenes de las especies *Aedes*, *Culex* y *Psorophora* fueron recolectados en zona urbana del distrito de Santa Marta y estudios previos indican que la asociación de estas especies con el entorno urbano se debe en cierta medida a su comportamiento antropofílico. Las alteraciones derivadas de la actividad humana generan nuevos hábitats que les beneficia ya que estas especies poseen características propias de especies invasoras (Rey y Lounibos, 2015).

*Ae. Aegypti* es considerado un mosquito de gran importancia médica por ser vector de virus como el dengue, chikungunya, Zika y fiebre amarilla. Adicionalmente, se ha sugerido que esta especie puede comportarse como vector del virus de la encefalitis equina venezolana, el virus Mayaro y el virus del Nilo Occidental (Gómez, 2018). El Dengue es una enfermedad endémica de más de 100 países tropicales y se estima que en el 2010 ocurrieron hasta 390 millones de infecciones en el mundo (Bhatt *et al*, 2013), en el 2013 el Chikungunya fue

introducido en la región de las Américas, infectando a millones de personas al igual que el Zika que se diseminó desde África e ingresó al país en 2015 (Álvarez *et al*, 2018). Estas enfermedades se encuentran principalmente en zonas tropicales y subtropicales y producen sintomatologías similares como la fiebre, dolores musculares, entre otros.

Especies del género *Culex*, como *C. pipiens* son consideradas vectores de virus de importancia médica como el virus del Nilo Occidental (Retana, Rodríguez y Barrientos, 2017), principal causa de encefalitis por arbovirus en todo el mundo, una enfermedad que puede producir desde una gripe sistémica a resultados neuroinvasivos como la meningitis (Coello, Gonzales y Martínez, 2019).

La especie del género *Psorophora*, como *P. cyanescens* son vectores de arbovirus de gran importancia médica y veterinaria en Colombia, como el virus de la encefalitis equina venezolana, causante de una enfermedad endémica en la parte norte de América del Sur y América central, caracterizada por síntomas como intensa cefalea, fiebre, escalofríos, mialgias, náuseas y vómitos (De la Hoz, 2000).

En las zonas rurales del distrito de Santa Marta fueron identificadas las especies *An. Neomaculipalpus* y *Ae. aegypti*. Estudios de especies de *An. neomaculipalpus* han descrito estos vectores en zonas rurales de Panamá (Simmons, 1936; Curry, 1931), en otros estudios se han encontrado en zonas rurales de extracción de oro y zona boscosa, esta especie es portadora de uno de los cuatro parásitos transmisores de malaria, *Plasmodium vivax*, no tan mortal como *Plasmodium falciparum*, pero de gran importancia epidemiológica (Moreno *et al*, 2005). Estudios realizados en pacientes concluyeron que la infección por *P. vivax* puede causar complicaciones de paludismo grave, produciendo malaria cerebral, anemia, insuficiencia renal, colapso circulatorio, sangrados anormal e ictericia (Kochar *et al*, 2005).

En zona selvática se identificaron mosquitos de la tribu Sabethini, como son las especies *S. chloropterus* y *W. arthrostigma*. Estudios previos indican que *S. chloropterus* es vector potencial del virus de la fiebre amarilla y se presume que los huecos de los árboles en partes altas del bosque son los principales criaderos, lugares de difícil acceso y localización (Navarro y Machado, 1995). La fiebre Amarilla es una enfermedad febril, hemorrágica y de alta mortalidad, en casos grave puede causar problemas cardíacos, renales y hepáticos (Velandia, 2004).

Este trabajo ratifica la importancia del estudio de estos vectores a través de las nuevas alternativas como lo es el código de barras de ADN, que proporciona información valiosa y de alta resolución cuando se combina con la taxonomía clásica. El aporte de información molecular de especies de mosquitos hematófagos en el departamento del Magdalena constituye un aporte de gran valor científico, evidencia los vacíos en el conocimiento e incentiva el estudio de la biodiversidad de este grupo taxonómico de gran importancia médica por considerarse potenciales vectores portadores y transmisores de enfermedades de gran impacto en la salud.

## CONCLUSIONES

La identificación de especies de mosquitos mediante la estrategia de código de barras de ADN permite acceder a la enorme biodiversidad de especies de mosquitos potenciales vectores de enfermedades de importancia médica y veterinaria. Existen limitaciones en el uso de la herramienta de código de barras de ADN derivadas de la carencia de información molecular disponible para ciertas especies y de la falta de curaduría de la información molecular depositada en las bases de datos. El presente estudio aporta nueva información sobre especies de vectores en tres diferentes escenarios del Distrito de Santa Marta (Selvático, Rural y Urbano), que puede ser aprovechada por las autoridades de salud como complemento al perfil epidemiológico en el distrito, con el fin de definir las acciones de prevención y control frente a la evidencia de circulación de arbovirus u ocurrencia de brotes de enfermedad.

## REFERENCIAS

- Ahumada, M. L., Orjuela, L. I., Pareja, P. X., Conde, M., Cabarcas, D. M., Cubillos, E. F., & Quiñones, M. L. (2016). Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria journal*, 15(1), 1-16.
- Alcaldía Distrital de Santa Marta (8 de febrero del 2021). Geografía. <https://www.santamarta.gov.co/geografia>.
- Álvarez Escobar, M. D. C., Torres Álvarez, A., Torres Álvarez, A., Semper, A. I., & Romeo Almanza, D. (2018). Dengue, chikungunya, Virus de Zika. Determinantes sociales. *Revista médica electrónica*, 40(1), 120-128.
- Baker, C. S., Cipriano, F., & Palumbi, S. R. (1996). Molecular genetic identification of whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology*, 5(5), 671-685.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control*. Springer, Heidelberg. 577pp.
- Beebe, N. (2018). Mosquitos de código de barras de ADN: consejos para potenciales buscadores. *Parasitología*, 145 (5), 622-633.
- Bethencourt, J. A. B., Peláez, J. J. L., Pestano, E. N., & Ramentol, C. L. (2017). Interaction of weather variables with dengue and *Aedes aegypti* in the municipality of Camagüey. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(1), 1-10.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507.
- Blaxter, M. (2003). Counting angels with DNA. *Nature*, 421(6919), 122-123.
- Chan, A., Chiang, LP., Hapuarachchi, H.C. (2014). DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites Vectors* 7, 569 <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0569-4>.
- Coello-Peralta, R., González-González, M., & Martínez-Cepeda, G. (2019). West Nile virus in Ecuador. *Revista MVZ Córdoba*, 24(1), 7151-7156.
- Curry, DP (1931). *Anopheles* (*Anopheles*) *neomaculipalpus*. Una nueva Especie del Grupo *Arribalzagia* de *Anopheles* de Panamá. *Revista estadounidense de higiene* , 13 (2).
- De la Hoz, F. (2000). Encefalitis equina Venezolana. *Revista MVZ Córdoba*, 5(1), 18-22.
- De Oliveira Aragão, A., Neto, J. P. N., Cruz, A. C. R., Casseb, S. M. M., Cardoso, J. F., da Silva, S. P., & Ishikawa, E. A. Y. (2019). Descripción y filogenia del genoma mitocondrial de *Sabethes chloropterus*, *Sabethes glaucodaemon* y *Sabethes belisarioi* (Diptera: Culicidae). *Genómica*, 111 (4), 607-611.
- Díaz-Nieto, L.M., Berron, C.I., Maciá, A., Berón, C.M. (2016). Taxonomía molecular de mosquitos. Buenos Aires: Universidad Nacional de Mar del Plata.

Eaton, M. J., Meyers, G. L., Kolokotronis, S. O., Leslie, M. S., Martin, A. P. y Amato, G. (2010). Codificación de barras de carne de animales silvestres: identificación molecular de vertebrados recolectados de África Central y América del Sur. *Genética de la conservación*, 11 (4), 1389-1404.

Efron, B. (1979). Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The Annals of Statistics*, 7, 1-26.

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology*, 11(4), 839-850.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates 3, 294–299.

Gómez, G. F. G. (2018). *Aedes* (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) and its importance in human health. *Cuban Journal of Tropical Medicine*, 70 (1), 55-70.

Harbach, R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, 1668(1), 591-638.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003a). *Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003b). *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl\_1), S96–S99. doi:10.1098/rsbl.2003.0025.

Hoyos-López, R., Pardo, S. R., Castaño, J. C., & Gallego-Gómez, J. C. (2015). Código de barras para la tipificación de culícidos inmaduros de Armenia y Circasia (Quindío, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2).

Hoyos-López, R. (2018). Tipificación molecular con código de barras COI-ADN de mosquitos con importancia médica del área rural de La Pintada, Antioquia, Colombia. *bioRxiv*, 260505.

Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., & Li, W. (2010). CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(5), 680–682. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq003>.

Jiménez, IP, Conn, JE y Brochero, H. (2014). Vectores de la malaria en San José del Guaviare, Orinoquia, Colombia. *Revista de la Asociación Estadounidense de Control de Mosquitos*, 30 (2), 91–98. <https://doi.org/10.2987/13-6382.1>

Kochar, D. K., Saxena, V., Singh, N., Kochar, S. K., Kumar, S. V., & Das, A. (2005). Plasmodium vivax malaria. *Emerging infectious diseases*, 11(1), 132.

Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007). DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 44(1), 01-07.

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

Linton, Y.-M., Samanidou-Voyadjoglou, A., & Harbach, R. E. (2002). *Ribosomal ITS2 sequence data for Anopheles maculipennis and An. messeae in northern Greece, with a critical assessment of previously published sequences. Insect Molecular Biology*, 11(4), 379–383. doi:10.1046/j.1365-2583.2002.00338.x.

Lipscomb, D., Platnick, N., & Wheeler, Q. (2003). *The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. Trends in Ecology & Evolution*, 18(2), 65–66. doi:10.1016/s0169-5347(02)00060-5.

Lozano-Zambrano, F. H., Jiménez, E., Arias-Penna, T. M., Arcila, A. M., Rodríguez, J., Ramírez, D. P., & Arias, T. M. (2008). Biogeografía de las hormigas cazadoras de Colombia. *Sistemática, biogeografía y conservación de las hormigas cazadoras de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia*.

Meusnier, I., Singer, G. A., Landry, J. F., Hickey, D. A., Hebert, P. D., & Hajibabaei, M. (2008). A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC genomics*, 9(1), 1-4.

Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, González R. (2011). Especies vectores de la malaria en Colombia: una revisión. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Ago; 106 Suppl 1 (Suppl 1): 223-38. doi: 10.1590 / s0074-02762011000900028. PMID: 21881778; PMCID: PMC4833002.

Moreno, J. E., Rubio-Palis, Y., Paez, E., Perez, E., Sanchez, V., & Vaccari, E. (2005). *Anopheles (Anopheles) neomaculipalpus: a new malaria vector in the Amazon basin? Medical and Veterinary Entomology*, 19(3), 329–332. doi:10.1111/j.1365-2915.2005.00572.x.

Munstermann, L. E., & Conn, J. E. (1997). SYSTEMATICS OF MOSQUITO DISEASE VECTORS (DIPTERA, CULICIDAE): Impact of Molecular Biology and Cladistic Analysis. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 351–369. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.351.

Muñoz-Gamba, Andrew S., Laiton-Donato, Katherine, Perdomo-Balaguera, Erick, Castro, Lyda R., Usme-Ciro, José A., & Parra-Henao, Gabriel. (2021). Molecular characterization of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Colombian rainforest. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 63, e24. Epub March 24, 2021. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202163024>.

Navarro, J. C., & Machado-Allison, C. (1995). Aspectos ecologicos de *Sabethes chloropterus* (Humboldt)(Diptera: Culicidae) en un bosque humedo del Edo. Miranda. Venezuela. *Bol Entomol Venez*, 10, 91-104.

Ortega, Y., Martínez, N., & Agapito, J. (2014). Código de barras de ADN en *Dactylopius coccus* Costa "cochinilla del carmín"(Hemíptera: Dactylopiidae): Estudio preliminar.

Padilla, J. C., Lizarazo, F. E., Murillo, O. L., Mendigaña, F. A., Pachón, E., & Vera, M. J. (2017). Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*, 37, 27-40.

Parra-Henao, G., & Suárez, L. (2012). Mosquitos (Díptera: Culicidae) vectores potenciales de arbovirus en la región de Urabá, noroccidente de Colombia. *Biomédica*, 32(2), 252-262.

Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta biológica colombiana*, 16(3), 161-175.

Quintero Gil, D. C., Osorio Benítez, J. E., & Martínez Gutiérrez, M. (2010). Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia*, 23(2), 146-156.

Retana-Salazar, A. P., Rodríguez-Arrieta, A., & Barrientos-Segura, A. (2017). West nile virus and its vectors: historical review, biology and ecology of aedes albopictus, culex pipiens and cx. quinquefasciatus. *Rev. costarric. public health*, 99-141.

Rey, J. R., & Lounibos, P. (2015). Ecología de Aedes aegypti y Aedes albopictus en América y transmisión enfermedades. *Biomédica*, 35(2), 177-185.

Rozo-Lopez, P., & Mengual, X. (2015). Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *ZooKeys*, (513), 39.

Simmons, J. S. (1936). Anopheles (Anopheles) neomaculipalpus, Curry, experimentally infected with Malaria Plasmodia. *Science (Washington)*, 84(2174).

Soghigian, J., Andreadis, TG y Livdahl, TP (2017). De los charcos en el suelo a los agujeros de los árboles: evolución convergente del hábitat y el fenotipo en los mosquitos Aedes *Biología evolutiva de BMC*, 17 (1), 1-13.

Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., & Vogler, A. P. (2003). A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(2), 70–74. doi:10.1016/s0169-5347(02)00041-1.

Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. "W-IQ-TREE: una herramienta filogenética en línea rápida para el análisis de máxima verosimilitud". Ácidos nucleicos Res. 8 de julio de 2016; 44 (W1): W232-5. doi: 10.1093 / nar / gkw256; Publicación electrónica del 15 de abril de 2016 PMID: 27084950.

Velandia, M. P. (2004). Yellow fever and its control. *Biomedical*, 24 (1), 1-2.

Wilkerson, R. C., Linton, Y.-M., Fonseca, D. M., Schultz, T. R., Price, D. C., & Strickman, D. A. (2015). Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. *PLOS ONE*, 10(7), e0133602. doi:10.1371/journal.pone.0133602.

Wilson, K. H. (1995). *Molecular Biology as a Tool for Taxonomy*. *Clinical Infectious Diseases*, 20(Supplement\_2), S117–S121. doi:10.1093/clinids/20.supplement\_2.s117.

Woodley, N.E., Borkent, A. & Wheeler, T.A. (2009). Phylogeny of Diptera. In Brown, B.V., Borkent, A., Cumming, J.M., Wood, D.M., Woodley, N.E. & Zumbado, M.A (Eds.), *Manual of Central American Díptera* Vol.1. (pp.79–94). NRC-CNRC Press, Ontario, 714pp.

Zamora-Delgado, J., Castaño, J. C., & Hoyos-López, R. (2015). DNA barcode sequences used to identify *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in La Tebaida (Quindío, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2), 212-217.